

Undersökning av förekomst av okända virus hos svenska fjällrävar med encefalit

Helena Thörnvall

Handledare: Mikael Berg
Inst. för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap,
avdelningen för Parasitologi och Virologi

Biträdande handledare: Anne-Lie Blomström
Inst. för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap,
avdelningen för Parasitologi och Virologi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary.....	2
Inledning.....	3
Bakgrund.....	3
Syfte.....	3
Litteraturoversikt.....	4
Fjällräven, <i>Alopex lagopus</i>	4
Analysmetoder för identifiering av okända virus.....	6
Material och metoder.....	8
Fjällrävsmaterial.....	8
Preparering av kliniskt material	9
DNA- och RNA-preparation.....	9
PCR.....	11
Kloning	12
Sekvensering	13
Kolonihybridisering.....	15
Resultat	17
Elektrofores.....	17
Sekvensering	18
Kolonihybridisering.....	20
Diskussion.....	21
Tack	24
Litteraturförteckning	25

SAMMANFATTNING

Fjällräven är en utrotningshotad art i Europa. Populationen minskade kraftigt i början av 1900-talet på grund av mycket intensiv jakt. Sverige fridlyste fjällräven 1928 men trots detta har stammen haft svårt att återhämta sig. Detta kan bero på flera orsaker, men de främsta är brist på föda och konkurrens från rödräven. Tillsammans med Norge och Finland har Sverige genomfört ett projekt som kallas SEFALO (Saving the Endangered Fennoscandian Alopex lagopus), vars mål har varit att förhindra fortsatt minskat populationsantal samt genom exempelvis stödutfodring hjälpa stammen att återhämta sig. För 10 år sedan fanns endast ca 40 vuxna fjällrävar i Sverige. I somras, när SEFALO-projektet avslutades, beräknades antalet till ungefär 140 vuxna individer.

I ett försök att öka antalet individer påbörjades 1992 ett uppfödningförsök av infångade vilda rävar. Tyvärr utvecklade flertalet av rävarna centralnervösa symtom och antingen avled eller avlivades. Många av dessa rävar visade sig ha allvarlig encefalit, men forskare har hittills inte kunnat hitta orsaken till sjukdomen. Man har undersökt förekomst av de vanligaste infektiösa agens som orsakar encefalit, men utan positiva resultat.

Huvudsyftet med detta arbete var att undersöka förekomst av okända virus hos svenska fjällrävar med encefalit, för att om möjligt finna ett agens som orsak till sjukdomen. I studien ingick fyra fjällrävar som visat neurologiska symtom. Från tre av rävarna undersöktes hjärnvävnad och från en undersöktes CSF. DNA och RNA extraherades från det kliniska materialet och genom användning av primers med slumpmässiga sekvenser skedde amplifiering av nukleotidsekvenserna med hjälp av PCR. Sekvenserna klonades sedan i *E.coli*-bakterier innan sekvensering utfördes.

Det material som användes i denna studie visade sig dock inte innehålla några agens som med säkerhet kan vara orsak till fjällrävarnas sjukdom. Det kan finnas olika anledningar till att inga virus med stor sannolikhet kunde identifieras. Viruskoncentrationen är oftast mycket låg, framför allt hos svårt sjuka djur, vilket försvårar detektionen. Virus kan även förekomma hos individen men inte i just den vävnadsbit som undersöks eller så finns viruset i ett annat organ. Till viss del stöder dock resultat av detta arbete tidigare studier där herpesvirussekvenser hittats.

För att fjällrävsstammen ska bevaras och fortsätta att öka, krävs fortsatta åtgärder samt ytterligare forskning om orsaken till sjukdomen.

SUMMARY

The arctic fox is under threat of extermination in Europe. The population decreased strongly at the beginning of the twentieth century because of intensive hunting. The arctic fox was placed under protection by law 1928 in Sweden but despite this the population has had difficulty to recover. This can depend on several reasons, but the main threats are shortage of food and competition from the red fox. Along with Norway and Finland, Sweden has carried out a project called SEFALO (Saving the Endangered Fennoscandian *Alopex lagopus*), whose objectives were to prevent continued decreased population numbers and through, for example supplementary feeding, help the population to recover. 10 years ago approximately only 40 adult arctic foxes were present in Sweden. Last summer, when the SEFALO-project was completed, the number was calculated to about 140 adult individuals.

In an attempt to increase the number of individuals a breeding programme with wild captured foxes started in 1992. Unfortunately, the majority of the foxes developed central nervous symptoms and either died or were euthanized. Many of these foxes had serious encephalitis, but researchers have not so far found the reason to the disease. One has looked for the most common infectious causes of encephalitis, but without positive results.

The main aim with this study was to examine occurrence of unknown viruses in Swedish arctic foxes with encephalitis, to if possible find a causative agent of this disease. The study included four arctic foxes who had shown neurological symptoms. Brain material was examined from three of the foxes and CSF from one of them. DNA and RNA were extracted from the clinical material and through the use of primers with random sequences, the nucleotide sequences were amplified with the aid of PCR. The sequences were then cloned in *E.coli*-cells before sequencing was carried out.

The result of this study showed that the material that was used did not for certain contain any agents that could have caused the arctic foxes' disease. There are different reasons why any virus couldn't be identified. The virus concentration is often very low, especially in very sick animals, and this makes the detection more difficult. Virus can also be present in the animal but not in the tissue sample that is examined or the virus can exist in another organ. To some extent this work supports earlier findings of a herpesvirus as a possible causative agent.

In order for the arctic fox population to survive and to continue to increase in number, further actions are required and also additional research about the causative agent behind the disease.

INLEDNING

Bakgrund

Fjällräven, *Alopex lagopus*, är en av de äldsta däggdjursarterna på den skandinaviska halvön. I början av 1900-talet var jakten på fjällrävar mycket intensiv på grund av ökad efterfrågan på deras vackra pälsar och populationen minskade därför kraftigt. I Sverige fridlystes fjällräven 1928, men trots detta skydd har fjällrävsstammen aldrig återhämtat sig. Norge fridlyste fjällräven 1930 och Finland först 1940. Fjällräven bedöms som akut utrotningshotad i hela Europa och är enligt Europeiska unionens habitatdirektiv en prioriterad art (Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008).

1998 fanns endast ca 40 vuxna fjällrävar i Sverige. Under fyra år (1998-2002) samarbetade Sverige och Finland i det EU-Life finansierade projektet SEFALO (Saving the Endangered Fennoscandian *Alopex lagopus*), vars mål bland annat var att stoppa nedgången i populationsantal och försöka hjälpa stammen att återhämta sig genom diverse åtgärder (Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008). Året efter att SEFALO avslutats startade SEFALO+, som pågick under fem år (2003-2008). Denna gång deltog även Norge i samarbetet. (Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008). Projektet avslutades den 1 juni i år och enligt uppskattning lever idag 140 vuxna fjällrävar i den svenska fjällkedjan (WWF, hemsida, 2008-09-09).

I ett försök att rädda fjällrävens situation startades ett uppfödningförsök 1992, vilket dock misslyckades på grund av att flertalet av rävarna utvecklade centralnervösa symtom och avled eller avlivades. Hos majoriteten av inskickade rävar till SVA konstaterades allvarlig encefalit. Forskare vid SVA och SLU har letat efter de vanligaste orsakerna till encefalit hos fjällrävar, men har hittills inte kunnat identifiera något definitivt agens som orsak till rävarnas sjukdom och symtom. Det finns fortfarande många, både akuta och kroniska sjukdomar, med okänd etiologi. Eftersom identifiering av okända virus är svårt och tidskrävande, utförs oftast studier på redan kända virus. För att kunna utveckla nya diagnostiska metoder, behandlingar och kunna sätta in profylaktiska åtgärder är identifiering av hittills okända virus dock en mycket viktig del av forskningen om infektiösa sjukdomar (Allander *et al*, 2005). Forskare runt om i världen har utvecklat olika metoder och varianter av tidigare tekniker, men de flesta metoder är mycket tidskrävande och komplicerade. I nuläget finns inga tillräckligt effektiva etablerade metoder för att påvisa hittills okända virus hos djur.

Syfte

Syftet med detta arbete är att undersöka förekomst av hittills okända virus hos svenska fjällrävar med påvisad encefalit. Samtidigt kommer ett första steg i utvärdering av en framtiden metod utföras för att på ett mer effektivt sätt kunna identifiera hittills okända virus hos andra sjukdomar där agens är okända. Fjällräven är utrotningshotad och ytterligare forskning kring orsaken till deras symtom behövs för att bryta den negativa populationstrenden. Genom att identifiera sjukdomsorsaken ökar möjligheten för att nya uppfödningförsök ska lyckas och därmed vara en av flera åtgärder för att rädda arten från utrotning.

LITTERATURÖVERSIKT

Fjällräven, *Alopex lagopus*

Enligt SEFALO kan det finnas flera förklaringar till varför fjällräven inte återhämtat sig trots fridlysningen. De största farorna för fjällrävens existens är troligen brist på föda samt konkurrens med rödräv, *Vulpes vulpes* (Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008).

Fjällräven är en allätare men deras huvudsakliga och viktigaste föda är lämmel och sork. Under vintern kan renkadaver vara viktig som föda. Tillgången på lämmel varierar cykliskt med en toppnotering ungefär vart fjärde år, så kallat lämmelår. Under året som följer är antalet lämlar mycket lågt. Fjällräven får svårt att hitta tillräckligt med föda och dödligheten bland rävarna är stor. Födottillgången påverkar även fjällrävens reproduktion. Kullstorleken kan variera mellan 3 och 6 valpar under år med måttlig tillgång på föda, och upp till 16 stycken under lämmelår (Projekt Fjällräv SEFALO+, hemsida). Under flera längre perioder har lämmelåren helt uteblivit (1930-1950, 1980-2000) och under dessa perioder har populationen kraftigt minskat. En av SEFALOs åtgärder har varit att stödutfodra fjällrävarna både under sommaren och vintern. Stödutfodring medför ökat antal kullar och kullstorlek samt att flera valpar överlever (Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008). Risken med stödutfodring är dock att även till exempel rödräv och järv kan finna det utplacerade fodret och äta av det. Stödutfodringen måste därför planeras och genomföras så att endast fjällräven utnyttjar den (Projekt Fjällräv SEFALO. Slutrapport juli 1998-december 2002).

Rödräven är dubbelt så stor som fjällräven och en betydelsefull konkurrent om föda, revir och lyor. Förutom detta kan rödräven döda både valpar och vuxna fjällrävar. Rödrävens utbredning på kalfjället har ökat och detta medför att fjällrävarna tvingas flytta till områden som är mindre optimala för dem och med sämre tillgång till föda. För att minska konkurrensen mellan de båda arterna och öka fjällrävens möjligheter till återhämtning bedrevs det inom SEFALO-projektet kontrollerad och noga planerad skydds jakt av rödräv (Projekt Fjällräv SEFALO. Slutrapport juli 1998-december 2002).

Fjällräven är mycket känslig för störningar, exempelvis från människor och hundar, under reproduktionsperioden. Störningar, både direkt och indirekt på avstånd, kan leda till att vuxna rävar och valpar lämnar lyan (Projekt Fjällräv SEFALO. Slutrapport juli 1998-december 2002). Under ripjaksäsongen har områden kring lyor där valpar kunnat identifieras därför avlysts för att lösspringande hundar inte ska störa fjällrävarnas beteende. För att öka förståelsen och kunskapen om fjällrävens situation har SEFALO även förmedlat information till allmänheten via bland annat tv, radio, föredrag, artiklar och publikationer (Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008).

Fjällräven kan drabbas av olika sjukdomar och parasiter, exempelvis rävs kabb vars följsjukdomar kan leda till döden (Projekt Fjällräv SEFALO+, hemsida). 1992 startades ett uppfödningssök där syftet var att fånga in vilda fjällrävar, föda upp avkomor och sedan släppa ut dessa i naturen. Uppfödningssöket misslyckades och avbröts dock på grund av att många av rävarna och deras avkomor utvecklade centralnervösa symtom. De drabbade rävarna antingen

självdog eller avlivades. Rävarna visade symtom såsom onormala rörelser, balanssvårigheter, ataxi, nedsatt luktsinne, blindhet, cirkelgång samt sväljningssvårigheter. Rävarnas sjukdomstillstånd förbättrades inte vid behandling med antibiotika, kortikosteroider och B-vitaminer (Berg *et al*, 2007).

Berg *et al* gjorde 2007 en studie på åtta fjällrävar med kliniska symtom som beskrivna ovan. Vid histopatologiskt undersökning av hjärnan sågs allvarlig nekrotiserande encefalit hos samtliga undersökta fjällrävar. Det finns flera möjliga orsaker som kan ge upphov till nekrotiserande encefalit; bakterier, virus och protozoer, liksom ischemi, vaskuliter, vissa läkemedel, toxiner och metaboliska sjukdomar. Enligt studien tydde de histopatologiska fynden på att skadorna i hjärnan orsakats av något infektiöst agens, men övriga orsaker kunde inte uteslutas helt. Redan kända agens som orsakar encefalit hos fjällrävar är *Toxoplasma gondii*, canine adenovirus typ 1, rabiesvirus och *Encephalitozoon cuniculi*. Hos karnivorer är det känt att *Neospora caninum*, *Listeria monocytogenes* och West Nile virus orsakar encefalit. Valpsjukevirus och bornavirus har orsakat encefalit hos andra rävarter än fjällräv. I studien undersöktes förekomst av ovan nämnda agens utan några positiva resultat. Förändringarna som sågs i hjärnan hos fjällrävarna skiljde sig också från de förändringar som vanligtvis ses vid encefalit orsakat av dessa agens. Fjällrävarna undersöktes också för förekomst av parasiter och bakterier, men även här blev resultaten negativa. Forskarna kunde i studien inte fastställa orsaken till rävarnas symtom och de kunde inte heller avgöra om de vilda fjällrävarna blev infekterade före eller efter infångandet (Berg *et al*, 2007).

Forskare vid SLU och SVA har dock identifierat ett herpesvirus som skulle kunna vara orsaken till rävarnas centralnervösa symtom och encefaliten. Enligt ett examensarbete från 2005 uppvisar detta herpesvirus stor likhet med BHV-1, vilket kan orsaka encefalit hos nötkreatur (Berggren, 2005). Hittills har viruset emellertid inte kunnat påvisas hos fjällrävar i det vilda (Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008), men det går inte helt att utesluta att det förekommer då herpesvirus kan ligga latent för att vid någon stressituation aktiveras och orsaka sjukdom.

För att en art i det vilda ska bevara sin genetiska balans och inte riskera inavel krävs det enligt beräkningar minst 500 individer (Projekt Fjällräv SEFALO+, hemsida). För närvarande ligger alltså den svenska fjällrävens populationsstorlek långt under denna nivå. Fjällrävens låga antal i kombination med att de lever utspridda på ett stort område gör att de får svårt att hitta en lämplig partner. Detta ökar risken för inavel och inavelsdepression samt att den genetiska variationen inom stammen minskar (Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008).

Åtgärderna inom SEFALO-projektet har gett positivt resultat och fjällrävens population har ökat under de senaste åtta åren. Det krävs dock att åtgärderna fortsätter även efter projektets avslutande för att hjälpa stammen till ytterligare återhämtning och för att minska inavelsrisken (Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008).

Analysmetoder för identifiering av okända virus

Ett stort problem vid identifiering av virus i kliniskt material är att virusets genom oftast finns i mycket låga koncentrationer och dessutom finns värdens DNA i betydligt högre koncentration. Detta gör att metoder för att finna virus ofta har två komponenter; amplifiering och selektion. I så kallade sekvensoberoende PCR (polymeras chain reaction)-metoder ligeras en primersekvens/adapter till båda ändar av ett DNA-fragment. Detta fragment kan sedan amplifieras genom PCR med en enda typ av primer. Dessa metoder kan användas för att amplifiera okända nukleinsyrasekvenser. Den mest kända varianten av sekvensoberoende PCR-metoder är sequence-independent, single primer amplification, SISPA (Allander *et al*, 2001).

SISPA beskrevs 1991 av Gregory R. Reyes och Jungsuh P. Kim. Denna metod har två stora fördelar. Den första är att metoden kan användas för att identifiera okända virus som förekommer i låg koncentration hos värden. Den andra fördelen är att det inte behövs någon virusodling, vilket tar väldigt lång tid. Olika typer av provmaterial kan utnyttjas och metoden kan upptäcka både enkelsträngade och dubbelsträngade DNA- och RNA-virus. En betydande nackdel är att proverna ofta innehåller riklig mängd nukleinsyror från värden och mitokondrier, men också från bakterier (Ambrose & Clewley, 2006). SISPA innebär alltså att amplifiering av DNA-sekvenser sker med hjälp av en enda typ av primer, vilket skiljer denna metod från standard PCR-tekniken. Likheten mellan SISPA och PCR är att DNA-sekvenserna amplifieras genom upprepade cykler av denaturering, annealing och extension med hjälp av Taq DNA polymeras (Reyes & Kim, 1991). Vid SISPA behandlas provmaterialet först genom filtering, DNAs-behandling samt centrifugering för att få bort celler från värden, extracellulärt DNA (exempelvis bakterier) och isolera viruspartiklar. Sedan sker en framrening av virusets genom. Om det inte är känt om provet innehåller DNA- eller RNA-virus, krävs det att materialet delas upp i två delar. SISPA bygger på att det finns dsDNA i provet, så om viruset är ett RNA-virus måste först cDNA bildas och om det är ett ssDNA virus måste en reaktion för att bilda en ytterligare DNA-sträng ske. Det dsDNA:t behandlas med restriktionsenzymer innan ligering av adapters sker vid ändarna av de bildade DNA-sekvenserna. Vid amplifieringen av de okända sekvenserna används sedan primers som är komplementära till den kända sekvensen på adaptern. DNA-fragmenten separeras sedan i en agarosgel genom elektrofores. De amplifierade genavsnitten kan sedan klonas och sekvenseras (Ambrose & Clewley, 2006).

Under åren har olika varianter av SISPA utvecklats. En av dessa är VIDISCA, Virus-Discovery-cDNA-AFLP. Det som skiljer denna metod från SISPA är att två olika adapters och primers används samt att två på varandra följande PCR-amplifieringar utförs. Vid den första PCR-amplifieringen används två primers som är specifika för de adapters som ligerats till DNA-fragmenten efter behandling med två olika restriktionsenzymer. Vid den andra PCR-amplifieringen används samma primers som vid den första, men med skillnaden att de är förlängda med en till tre nukleotider vid ena änden. Om varje primer förlängs med en nukleotid finns det 16 möjliga primerkombinationer. Genom att använda två adapters och primers samt PCR enligt ovan görs denna metod mer sensitiv och specifik än SISPA (Ambrose & Clewley, 2006).

Representational difference analysis, RDA, är en metod som, genom sekvensoberoende PCR-amplifiering och subtraktionshybridisering, används för att finna skillnader i två nästan identiska prover/genom. Denna kombination gör metoden effektiv och mycket känslig. När det gäller virusforskning är de två proverna oftast tagna före och efter infektionstillfället hos samma individ. Provet som tagits innan infektion kallas "driver" och provet taget efter infektion kallas "tester". Testerprovet innehåller alltså patogena sekvenser, vilket driverprovet inte gör (Ambrose & Clewley, 2006). Båda DNA-proverna behandlas först med restriktionsenzymer för att minska komplexiteten inom genomet. Nästa steg är ligation av adapters till DNA-fragmenten i enbart testerprovet. Dessa adapters utgör komplementära sekvenser till primrarna vid senare PCR-amplifiering. Driver- och testerprovet blandas, upphettas för att denaturera DNA:t och sedan sänkts temperaturen så att hybridisering kan ske. Vid denna hybridisering kan tre olika dubbelsträngade sekvenskombinationer bildas; tester-tester, tester-driver, driver-driver. Ändarna av de dubbelsträngade DNA-fragmenten byggs på så att strängarna blir lika långa. Sedan sker en amplifiering med PCR och primrar som binder till adaptersekvenserna. Eftersom sekvenserna som innehåller två DNA-strängar från driverprovet inte innehåller någon adapter för primrarna sker det inte heller någon amplifiering av dessa sekvenser. Sekvenserna som däremot innehåller en eller två strängar från testerprovet kommer att amplifieras. I och med detta amplifieras alltså unika DNA-sekvenser från två prover genom att lika sekvenser tas bort (Ambrose & Clewley, 2006). Nackdelen med RDA är att det krävs två prover från individen, vilket i praktiken kan vara svårt att erhålla. Det är heller ingen garanti att driverprovet verkligen är helt fritt från patogener eftersom individen kan vara i inkubationsfasen och inte visar symtom än eller att individen bär på ett latent virus.

En annan metod är så kallad slumpmässig PCR. Liksom vid VIDISCA utförs två efterföljande PCR-amplifieringar. Vid den första tillsätts primers som har en unik nukleotidsekvens vid ena änden och en slumpmässig sekvens vid den andra änden. Den unika sekvensen binder inte till DNA:t, utan fungerar som bindningsplats för primers vid den andra PCR-amplifieringen. Dessa primers är alltså komplementära till den unika nukleotidsekvensen. Detta gör att en adapters inte behöver liggas till nukleotidsekvensen såsom vid SISPA. I likhet med SISPA kan slumpmässig PCR identifiera både DNA- och RNA-virus (Ambrose & Clewley, 2006), och båda metoderna amplifierar effektivt och ospecifikt DNA:t som finns i provet (Allander *et al*, 2001).

Oavsett vilken metod för amplifiering som används, krävs sekvensering av ett stort antal kolonier på grund av att viruset oftast finns i mycket låga koncentrationer och risken att inte hitta ett eventuellt befintligt virus är stor om endast några kolonier väljs ut. Detta gör metoderna väldigt tidsmässigt ineffektiva (Allander *et al*, 2001).

Den metod som jag arbetat med under detta arbete bygger på en metod som presenteras av Allander *et al* i en artikel från 2005. Metoden är på många sätt lik SISPA men med skillnaden att inga restriktionsenzymer används för att klyva genomet samt att ligation av adapters inte ingår. Metoden går ut på att virus koncentreras genom centrifugering och att så mycket som möjligt av värdens DNA reduceras genom filtrering och DNase-behandling. Sedan extraheras DNA

och RNA och amplifieras genom slumpmässig PCR. Innan PCR-amplifieringen syntetiseras dsDNA samt cDNA med hjälp av specialdesignade primers med slumpmässig nukleotidsekvens vid 3'-ändan. PCR-produkterna renas sedan fram och därefter separeras och storleksbestäms de genom elektrofores på en agarosgel. PCR-produkterna ligeras till en vektor, som sedan transformeras in i bakterier, vilka odlas upp på agarplattor (kloning). Sekvensering utförs sedan efter amplifiering av material från bakteriekolonierna. Författarna av artikeln beskriver metoden som generell, icke selektiv och snabb. Metoden kräver ingen virusodling eller provmaterial från före och efter infektion, och anses därför användbar vid identifiering av okända virus (Allander *et al*, 2005).

MATERIAL OCH METODER

Fjällrävsmaterial

I studien ingår fyra fjällrävar som skickats in till SVA mellan åren 2001 och 2004. Rävarna valdes ut med tanke på tydliga neurologiska symtom samt obduktionsfynd. Tabell 1 visar en översikt av fjällrävarna som ingår i studien; ankomstår till SVA, ursprung, ålder, kliniska fynd, histopatologisk diagnos samt vilken typ av vävnad som undersökts.

Tabell 1. Översikt av fjällrävarna som ingår i studien (Källa: SVA)

SVA-nummer	År	Ursprung	Ålder	Kliniska fynd	Histopatologisk diagnos	Undersökt vävnad
V1276/01	2001	Nordens ark	6 månader	Cirkelgång under 1 månad, sov mycket, försämrad balans	Grav encefalit	Hjärna
V4/02	2002	Nordens ark	8 månader	CNS-symtom: orädd, bet på föremål, ostadig gång, depression	Grav encefalit	Hjärna
V700/2	2002	Stockholms universitet	-	-	-	Hjärna
V775/04	2004	Nordens ark	10 år	Förlorat hörsel och smak. Tuggsvårigheter. Avlivad vid SVA.	Nekrotiserande encefalit	CSF

Preparering av kliniskt material

Vävnadsbitar från hjärna homogeniserades först i 1x DNase-buffert (DNase I recombinant, RNase-free, Incubationbuffer, Roche) och centrifugerades sedan 2 x 10 min vid 4000 rev/min. CSF-provet från en av råvarna späddes i 1x DNase-buffert. Den cellfria fasen från samtliga prover filtrerades sedan genom ett 0,45µm sprutfilter. Varje prov delades upp i 200 µl alikvoter, till vilka 10 µl (10 U/µl) DNase (DNase I recombinant, RNase-free, DNase, Roche) och 1 µl (2 µg/µl) RNase (RNase A, Invitrogen) tillsattes. DNase och RNase är enzymer som bryter ner nukleinsyror och används för att få bort värdjurets DNA respektive RNA. Proven inkuberades sedan i 37°C-igt vattenbad under 2 timmar. Därefter delades proverna upp så att hälften av proverna från respektive fjällräv användes till DNA-undersökning och hälften till RNA-undersökning.

DNA- och RNA-preparation

DNA- och RNA-extraktion

DNA-extraktion och RNA-extraktion utfördes genom att använda QIAamp DNA Mini Kit respektive RNeasy Mini Kit från QIAGEN och protokollen som medföljer dessa enligt nedan.

Vid DNA-extraktionen tillsattes först 20 µl QIAGEN Proteinase K samt 200 µl Buffer AL (lyseringsbuffert) till varje prov. Proteinase K bryter ner proteiner, tar bort kontaminering samt inaktiverar nukleaser som annars kan bryta ner DNA vid framrening (Sambrook & Russel, 2001). Rören inkuberades i 56°C-igt vattenbad i 10 min. Därefter tillsattes 200 µl 99,5 % etanol. Proven från respektive fjällräv poolades i var sin QIAamp Spin Column (innehåller ett membran till vilket DNA:t binder) vilken centrifugerades vid 6000g i 1 min mellan varje provtillsats. DNA binder vid detta steg till membranet i kolonnen. Membranen tvättades två gånger med 500 µl Buffer AW1 respektive Buffer AW2. Mellan tillsatserna av tvättbuffert centrifugerades kolonnerna vid 6000g i 1 min. Efter tillsatts av Buffert AW2 centrifugerades kolonnerna vid 20 000g i 3 min. Därefter centrifugerades kolonnerna ytterligare 1 min vid 20 000g för att få bort all tvättbuffert. För att eluera DNA från membranet tillsattes 50 µl Buffer AE (elutionsbuffert) och kolonnerna inkuberades under 1 min i rumstemperatur för att sedan centrifugeras i 1 min vid 6000g.

Vid RNA-extraktionen tillsattes 750 µl Trizol till respektive rör. Trizol är ett ämne som bryter ner celler och cellkomponenter, förstör proteiner, bryter ner kapsider på virus, men bevarar RNA intakt (Sambrook & Russel, 2001). Rören inkuberades i rumstemperatur 5 min. Därefter tillsattes 150 µl kloroform. Kloroform gör att RNA-fasen separeras från DNA- och den organiska fasen. Rören skakades hårt under 15 sekunder och inkuberades sedan i rumstemperatur i 3 min. Efter detta centrifugerades rören 15 min vid 12 000g i +4°C. RNA-fasen som bildades fördes över till ett eppendorfrör och samma volym av 70 % etanol tillsattes. Proven från respektive fjällräv poolades i var sin RNeasy Mini Spin Column (innehåller ett membran till vilket RNA:t binder), vilket centrifugerades vid 8000g i 15 sek. Membranen tvättades två gånger; först med 700 µl Buffer RW1 och sedan med 500 µl Buffer RPE (innehåller etanol). Efter tillsatts av respektive tvättbuffert centrifugerades kolonnerna 15 sekunder vid 8000g. Ytterligare 500 µl Buffer RPE tillsattes till kolonnerna, vilka därefter

centrifugerades 2 min vid 8000g för att torka membranet. För att avlägsna eventuellt kvarvarande Buffer RPE centrifugerades kolonnerna igen 1 min vid 13000 g. Om det finns kvar etanol i provet kan detta störa senare reaktioner. För att eluera RNA från membranet tillsattes 30 µl RNase-fritt vatten på membranet i respektive kolonn, som sedan centrifugerades 1 min vid 8000g. Steget med RNase-fritt vatten och centrifugering upprepades.

Inmärkning av DNA med FR26RV-N

För att senare kunna utföra PCR krävs att en viss sekvens av genomet är känt, till vilken primers då kan fästa. Eftersom genomet hos eventuella virus i detta arbete är okända har slumpmässiga primers, FR26RV-N, använts för inmärkning av både DNA:t och cDNA:t. FR26RV-N är primers med en känd nukleotidsekvens till vilken en slumpmässig nukleotidsekvens fästs (GCCGGAGCTCTGCAGATATC-NNNNNN). Vid PCR-amplifieringen används sedan en primer med samma kända nukleotidsekvens men utan den slumpmässiga delen (FR20RV).

DNA-proverna från respektive fjällräv poolades till ett prov för att underlätta vidare hantering och senare sekvensering. I ett rör blandades totalt 21 µl DNA (5 µl av V4/02, 5 µl av V1276/01, 1 µl av V700/02, 10 µl av V775/04), 1,5 µl 10 mM dNTP Mix (10 mM av varje dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 µl primer FR26RV-N (10 µM) samt 2,7 µl NEBuffer 2 (New England, BioLabs Inc). Provet inkuberades i 94°C i 2 min och sattes därefter 2 min på is. 0,5 µl exo^- Klenow DNA polymeras (5,0 U/ml) (New England, BioLabs Inc) tillsattes till provet som sedan inkuberades i 37°C i 60 min och 92°C i 2 min. Provet sattes på is i 2 min och därefter tillsattes ytterligare 0,5 µl exo^- Klenow DNA polymeras. Provet inkuberades i 37°C i 60 min och 75°C i 10 min.

RiboMinus

Borttagning av rRNA utfördes med hjälp av RiboMinusTM Transcriptome Isolation Kit, InvitrogenTM. Detta kit är dock framställt för borttagning av rRNA i RNA-prover från människa och mus. Det är oklart om och hur väl metoden även fungerar på andra djurslag. Steget påverkar dock inte slutresultatet negativt även om det inte fungerar optimalt på fjällrävar. Metoden innebär att specifika prober för 18S och 28S rRNA inmärkta med biotin tillsätts till RNA-provet. Dessa prober binder till sekvenser på rRNA och genom att tillsätta magnetiska kulor belagda med streptavidin kan rRNA avlägsnas från provet. Streptavidin är ett protein med stark affinitet till vitaminet biotin (Sambrook & Russel, 2001).

Även här poolades RNA-proverna från respektive fjällräv. I ett rör blandades totalt 20,5 µl RNA (7,5 µl av V4/02, 2,5 µl av V700/02, 3 µl av V1276/01, 7,5 µl av V775/04), 0,8 µl RiboMinusTM Human/Mouse Probe (100 pmol/µl) samt 40 µl betainehybridiseringsbuffert. Röret inkuberades i 70°C i 5 min och satte sedan på is i 2 min. 55 µl av RiboMinusTM Magnetic Beads (magnetiska kulor som är belagda med streptavidin) tillsattes till ett eppendorfrör som placerades i en rörställning med små magneter. De små kulorna drogs mot magneten och fastnade på kanten av röret. Lösningen i botten av röret avlägsnades. 55 µl Super-Q vatten tillsattes, röret vortexades och placerades vid magneten igen. Lösningen i botten av röret avlägsnades. Detta steg upprepades en ytterligare gång. 55 µl betainehybridiseringsbuffert tillsattes, röret vortexades och placerades mot magneten. Lösningen i botten av röret avlägsnades. 22 µl

betainehybridiseringsbuffert tillsattes, röret vortexades och inkuberades sedan i 37°C i 2 min. Till detta rör tillsattes sedan RNA-probe-mixen och provet inkuberades sedan i 37°C i 30 min. Under denna tid vortexades provet var 5:e min. Röret placerades sedan vid magneten och lösningen i botten överfördes till ett nytt eppendorfrör vilket sattes på is. Denna lösning innehåller nu RNA av intresse, RiboMinus RNA. 50 µl betainehybridiseringsbuffert tillsattes till röret med de magnetiska kulorna, röret vortexades och inkuberades i 50°C i 5 min. Röret placerades vid magneten och lösningen i botten överfördes till röret med RiboMinus RNA.

Koncentrering av RiboMinus RNA utfördes genom att använda RiboMinus™ Concentration Module, Invitrogen™ och medföljande protokoll. Till provet med RiboMinus RNA tillsattes 100 µl av Binding Buffer respektive 99,5 % etanol. Röret vortexades och provet överfördes till en centrifugeringskolonn. För att binda RNA:t till membranet i kolonnen centrifugerades den vid 12 000g under 1 min. Vätskan som samlades i uppsamlingsröret avlägsnades. Membranet tvättades två gånger genom tillsatts av 200 µl Wash Buffer och centrifugering vid 12 000 g i 1 min. Vätskan i uppsamlingsröret avlägsnades och för att få bort eventuellt kvarvarande tvättbuffert centrifugerades kolonnen i ytterligare 3 min vid 12 000g. RNA:t eluerades genom tillsatts av 21 µl RNase-fritt vatten, inkubering i rumstemperatur i 1 min och sedan centrifugering vid 12 000g i 1 min.

Syntes av ds cDNA inmärkt med FR26RV-N

För att kunna utföra PCR på RNA krävs att RNA:t görs om till dubbelsträngat cDNA. Detta gjordes genom att blanda 2 µl primer FR26RV-N (10 µM), 10 µl rent och koncentrerat RiboMinus RNA samt 1 µl 10 mM dNTP Mix (10 mM av varje dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Denna blandning inkuberades i 65°C i 5 min för att denaturera RNA:t så att primrarna kan binda. Röret sattes sedan på is i 1 min under vilken primrarna binder till RNA:t. Till röret tillsattes en blandning av 4 µl 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 1µl 0,1 M DDT (Invitrogen), 1 µl RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (40 U/µl) (Invitrogen) samt 1 µl SuperScript™ III RT (200 units/µl) (Invitrogen). Röret inkuberades först i 25°C i 5 min och sedan i 50°C i 60 min. Inaktivering av enzymet skedde genom värming vid 70°C i 15 min. För att syntetisera ds cDNA tillsattes 0,5 µl exo⁻ Klenow DNA polymeras (5,0 U/ml) (New England, BioLabs Inc). Provet inkuberades i 37°C under 60 min och därefter skedde inaktivering av enzymet genom värming vid 75°C i 10 min.

PCR

PCR-amplifiering med primer FR20RV

Vid PCR amplifieras DNA-sekvenser med hjälp av nukleotider (dNTPs), primers (korta nukleotidsekvenser komplementära till sekvenser på var sin sida om önskad DNA-sekvens) samt DNA-polymeras. Det första steget är denaturering av det dubbelsträngade DNA:t vid ca 94°C. Sedan sker en temperatursänkning till 50-60°C, vid vilken primers fäster till DNA:t (annealing). Därefter höjs temperaturen till ca 70°C. Då sker syntes av ny dubbelsträngad DNA-sträng genom att DNA-polymeras bygger på nya nukleotider med början vid primrarna. Genom att upprepa temperaturstegen i ett antal (vanligtvis 25-30) cykler fås en stor mängd kopior av DNA-sekvensen (Brown, 2001).

I vardera två PCR-rör blandades 5 µl 10X PCR Buffert (Roche), 5 µl MgCl₂ (25 mM) (Roche), 4 µl 10 mM dNTP Mix (2,5 mM av varje dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 4 µl primer FR20RV (GCCGGAGCTCTGCAGATATC) (10 µM), 0,5 µl Taq DNA polymeras (AmpliTaq Gold®, 5 U/µl, Roche) samt 26,5 µl Super-Q vatten. Till respektive PCR-blandning tillsattes 5 µl templat (DNA inmärkt med FR26RV-N respektive ds cDNA med FR26RV-N). PCR utfördes enligt följande temperatursteg; 95°C i 12 min, (95°C i 30 sek, 60°C i 30 sek, 72°C i 90 sek) x 35 samt 72°C i 5 min.

Rening av PCR-produkterna

För att avlägsna exempelvis primers och nukleotider som blivit över och enzymer renades PCR-produkterna. Denna rening utfördes med hjälp av QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN. Först tillsattes 500 µl Buffer PB (bindningsbuffert) till proverna med PCR-produkterna och sedan överfördes blandningen till var sin QIAquick Spin Column. Rören centrifugerades vid 13 000 rpm i 1 min varvid DNA:t band till membranet i kolonnen. Vätskan i uppsamlingsrören avlägsnades. Till varje kolonn tillsattes 750 µl Buffer PE (tvättbuffert), rören centrifugerades vid 13 000 rpm i 1 min och vätskan i uppsamlingsrören avlägsnades. Rören centrifugerades igen vid 13 000 rpm i 1 min för att få bort eventuellt kvarvarande tvättbuffert. För att eluera DNA:t från membranet placerades kolonnerna i var sitt eppendorfrör och 30 µl Buffer EB (elutionsbuffert) tillsattes. Rören inkuberades i 1 min i rumstemperatur för att sedan centrifugerades vid 13 000 rpm under 1 min.

Elektrofores

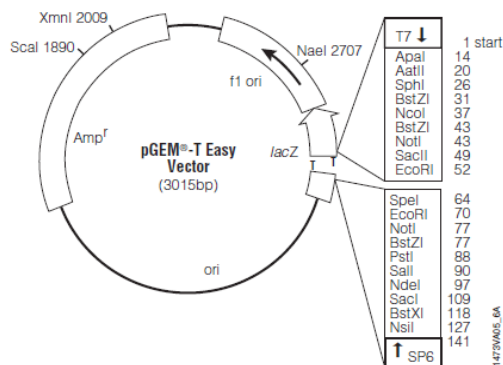
För att kontrollera att det fanns DNA-sekvenser i proverna samt bestämma ungefärlig mängd av PCR-produkterna inför ligering, visualiserades de rena PCR-produkterna (5 µl/prov) genom elektrofores i en 1,5 %-ig agarosgel innehållande etidiumbromid (fluorescerande färgämne). Som storleksmarkör användes 1kb DNA-Ladder Plus (0,1 µg/µl) (GeneRulerTM, Fermentas). Gelen belystes därefter med UV-ljus och resultatet visas i figur 2.

Kloning

För att ytterligare amplifiera gensekvenserna användes kloning. Först sker ligering av DNA-fragmenten till en vektor (exempelvis plasmider) med hjälp av enzymet DNA ligas, så att rekombinanta DNA-molekyler bildas. Varje vektor tar endast upp ett DNA-fragment. Nästa steg vid kloning är så kallad transformering. Detta innebär att de rekombinanta DNA-molekylerna sätts in i bakterier så att det bildas transformerade bakterier. Förflyttningen av DNA in i kompetenta bakterier sker genom att temperaturen under kort tid höjs till 42°C. De flesta plasmidvektorer bär minst en gen som ger antibiotikaresistens hos värdcellen. Genom att odla transformerade bakterier på agarplattor med antibiotika tillsatt, så kan endast bakterier som tagit upp plasmiden växa på plattorna. Odling på ett selektivt medium gör det alltså möjligt att urskilja transformerade bakterier från icke-transformerade. Innan de transformerade bakterierna stryks ut på plattor efter värmebehandlingen så måste genen för antibiotikaresistens börja uttryckas samt tillräckligt med enzym, som detoxifierar antibiotika, börja tillverkas. Därför placeras bakterierna i ett vätskemedium, utan antibiotika, och inkuberas under konstant rörelse i 37°C i 1 timme. Sedan sker själva kloningen. Detta innebär att

bakterierna, som innehåller plasmiderna med DNA-sekvenserna, tillväxer och förökas och därmed kommer plasmiderna med DNA-sekvenserna också att förökas. Svårigheten sedan är att fastställa vilka av de transformerade kolonierna som innehåller celler med rekombinanta DNA-molekyler, och vilka som innehåller självkligerade vektormolekyler (Brown, 2001).

DNA-fragmenten ligerades först till en plasmid (vektor) (figur 1) enligt pGEM®-T Easy Vector System (Promega). Denna vektor bär på en gen för ampicillinresistens samt innehåller två RNA polymeras promoters som kallas T7 och SP6. Till dessa promoters kommer senare använda primrar (T7 respektive SP6) att binda vid PCR-amplifiering. 4 µl ren PCR-produkt (DNA respektive cDNA) blandades samman med 0,5 µl pGEM®-T Easy Vector (50 ng/ µl), 0,5 µl T4 DNA ligas (3u/µl) samt 5 µl 2X Rapid Ligation Buffer (ligeringsbuffert). Proverna inkuberades sedan över natt vid 4°C.



Figur 1. pGEM®-T Easy Vector innehållande gen för ampicillinresistens samt promoters T7 samt SP6. (Källa: Promega, hemsida, 2008-11-22)

Till 30 µl kompetenta *E.coli*-bakterier tillsattes 4 µl rekombinanta DNA-molekyler. Rören inkuberades 30 min på is och sedan i 42°C under 45 sekunder. Proven sattes kort på is, för att därefter föras över till 500 µl LB-medium. Proverna inkuberades i 37°C i 1 timme under konstant skakning (220 rpm). Därefter ströks först 50 µl av de transformerade bakterierna ut på LB-agarplattor tillsatta med ampicillin. Resterande medium med bakterier centrifugerades 3 min vid 10 500 rpm. Det mesta av mediet hälldes av och pelleten i botten av röret löstes upp i en liten mängd kvarvarande medium. Detta ströks sedan ut på nya agarplattor. Plattorna inkuberades i 37°C över natt.

Sekvensering

Sekvensering innebär att den exakta ordningen på nukleotiderna i DNA:t bestäms. Den metod jag använt är den mest använda och kallas chain-terminating eller dye-terminating. Metoden liknar en vanlig PCR-reaktion med denaturering, annealing samt elongering, men med två skillnader. Vid så kallad cykelsekvensering används endast en primer, vilket innebär att endast en sträng av DNA:t kopieras. Dessutom innehåller reaktionen fyra olika dideoxynukleotider (ddNTPs), förutom de fyra vanliga deoxynukleotiderna (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Dideoxynukleotiderna fungerar som stoppnukleotider genom att de saknar den

OH-grupp som krävs för att binda ihop två nukleotider vid elongeringen. De fyra dideoxynukleotiderna är märkta med var sin fluorescerande färg, vilka fluorescerar vid olika våglängder vid belysning med laser. Dideoxynukleotiderna införlivas slumpmässigt vid DNA-syntesen och detta leder till en produkt med DNA-fragment av olika storlekar. Dessa fragment separeras avseende längd i ett system som använder kapillärelektrofores och en detektor läser av den fluorescerande signalen som varje fragment avger (Brown, 2001).

PCR

Innan PCR, för att amplifiera ligerade DNA-sekvenser, utfördes på klonade bakterier, fick bakterierna växa till under konstant rörelse i 37°C ett par timmar i LB-medium till vilken ampicillin (50 mg/ml) tillsatts. Enskilda kolonier (240 stycken från klonade DNA- respektive cDNA-sekvenser) plockades upp med hjälp av en pipett, som sedan placerades i 1,5 ml LB-medium med ampicillin. Efter tillväxt utfördes PCR enligt standard PCR-lösning 25 µl/prov. PCR-lösningen innehöll 10X PCR Buffer (Roche), MgCl₂ (25 mM) (Roche), 10 mM dNTP Mix (2,5 mM av varje dATP, dTTP, dCTP, dGTP), primer T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) (10µM), primer SP6 (ATTTAGGTGACACTATAG) (10 µM), Taq DNA polymeras (AmpliTaq Gold®, 5 U/µl, Roche), Super-Q vatten samt templat i de volymer som anges i tabell 2. PCR utfördes enligt följande temperatursteg: 95°C i 12 min, (95°C i 30 sek, 60°C i 30 sek, 72°C i 90 sek) x 35 samt 72°C i 5 min.

Tabell 2. PCR-lösning (25 µl/prov) inför sekvensering

	Volym/prov (µl)
10X PCR Buffert	2,4
MgCl ₂ (25 mM)	2,4
dNTP Mix (10 mM)	2,4
primer T7 (10µM)	1
primer SP6 (10 µM)	1
Taq DNA polymeras (5 U/µl)	0,25
Super-Q vatten	14,6
Templat	1

För att avgöra vilka prover som var positiva, dvs innehöll ligerade DNA-sekvenser, och vilka som var negativa, dvs självligerade vektorer utfördes elektrofores. PCR-produkterna (5 µl/prov) visualiserades i en 1,5 %-ig agarosgel innehållande etidiumbromid. 1kb DNA-Ladder Plus (GeneRuler™, Fermentas) användes som storleksmarkör. Gelen belystes därefter med UV-ljus och ett exempel på hur resultatet såg ut visas i figur 3. Bland de band som var tydligast valdes 192 positiva prover ut från respektive DNA- och cDNA-produkterna.

Rening av PCR-produkterna

För att få bort övertaliga nukleotider och primers innan sekvensering, utfördes rening av de utvalda PCR-produkterna med hjälp av enzymerna Exonuclease I (E.coli) samt Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Exonukleaset bryter ner primers

medan SAP tar bort nukleotiderna. Reningslösningen bestod av 0,1 µl 10x Reaction Buffer for Exonuclease I, 3,9 µl Super-Q vatten, 0,5 µl Exonuclease I, E.coli (20 u/µl) samt 0,5 µl SAP (1 u/µl); totalt 5 µl/prov PCR-produkt. Därefter utfördes reningen i två på varandra följande temperatursteg; 37°C i 30 min och sedan 95°C i 10 min.

För att bestämma den mängd PCR-produkt som behövdes för cykelsekvensering utfördes elektrofores på en 1,5 %-ig agarosgel innehållande etidiumbromid. 2-5 µl/prov av utvalda renade PCR-produkter kördes ut på gelen.

Cykelsekvensering

Cykelsekvenseringen utfördes med hjälp av BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems. Sekvenseringslösningen innehöll 1 µl BigDye Reaction Mix, 1,5 µl 5X Sequencing Buffer, 1 µl primer T7 eller SP6 (5 µM), x µl ren PCR-produkt (bestämde utifrån hur starka banden var på elektroforesen efter reningen) samt x µl Super-Q vatten så att totala volymen blev 10 µl/prov. Cykelsekvenseringen utfördes enligt följande temperatursteg; 95°C i 30 sek, (95°C i 15 sek, 50°C i 10 sek, 60°C i 4 min) x 25.

Precipitering och sekvensering

För att avlägsna kvarvarande produkter från cykelsekvenseringen (enzym, primer, nukleotider) utfördes precipitering genom att använda Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit. Till varje prov tillsattes 25 µl Injection Solution. Proverna fördes över till en SEQ₉₆-platta. Med hjälp av vakuum (23-25" Hg) under 3 minuter sögs vätskan från brunnarna och genom ett membran på undersidan av plattan. DNA:t stannar kvar på membranet. Därefter tillsattes 25 µl Injection Solution till varje brunn. Vakuumsteget upprepades en gång till. Ytterligare 25 µl Injection Solution tillsattes till samtliga brunnar, och plattan placerades på skakning i 10 min (för att lösa upp DNA:t i lösningen). Proverna överfördes sedan till en sekvenseringsplatta och placerades i sekvenseringsmaskinen.

Kolonihybridisering

Kolonihybridisering är en metod för identifiering av vilka bakteriekolonier på en agarplatta som innehåller en speciell DNA-sekvens eller en speciell gen utan att behöva sekvensera samtliga kolonier. Tekniken involverar att man lägger ett nylonmembran på plattan så att varje koloni ger ett avtryck på membranet. Sedan behandlas membranet med kemikalier och värme eller UV-strålning. Membranen tvättas sedan med en probe för att hitta den speciella DNA-sekvensen. Avtrycken som påvisas av proben jämförs sedan med kolonierna på agarplattan. Kolonihybridisering är inte användbart om viruset är okänt eftersom det krävs att nukleinsyrasekvensen är känd för att kunna tillverka korrekt probe (Brown, 2001).

Vid utförande av kolonihybridisering användes Borna disease virus, BDV, som modellsystem. Celler från råttor (C6-celler) infekterade med BDV behandlades med DNase och RNase som beskrivet ovan vid preparation av kliniska material från fjällrävar. Sedan utfördes RNA-extraktion, syntes av ds cDNA inmärkt med FR26RV-N, PCR, rening av PCR-produkterna samt ligering och kloning som beskrivet ovan. Vid kloning användes även en vektor med gen från LPMV (porcine paraxovirus) som negativ kontroll och som positiv kontroll användes en vektor innehållande p23-genen från BDV. Vid syntes av prober till

hybridiseringen utfördes PCR med cDNA från BDV och fyra olika primerkombinationer, vilka redovisas i tabell 3.

Tabell 3. Primerkombinationer som användes vid syntes av prober till kolonihybridisering

Forward	Reverse	Längd på PCR-produkt (bp)
BDV1F	BDV652r	652
p40A	p40B	728
BDV778f	p23b	1091
p23c	2383r	936

Nylonmembran lades på agarplattor med bakterier innehållande klonade BDV-sekvenser. Membranen behandlades med denatureringslösnig (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), neutralisationslösning (1,5 M NaCl, 1,0 M Tris-HCl, pH 7,4) samt 2x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM natriumcitrat, pH 7,0). Membranen inkuberades i 15 minuter i respektive lösning. För att binda DNA:t till membranen belystes de med UV-ljus i 30 sekunder vid 125 mJ. För att avlägsna celldebris behandlades membranerna sedan med Proteinase K (10 mg/ml) spädd 1:10 i 2x SSC och inkuberades i 37°C i 1 timme.

Hybridisering, tvättning och immunologisk detektion

Probemärkning, hybridisering samt immunologisk detektion utfördes enligt DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, Roche. Med hjälp av medföljande buffertlösning innehållande slumpmässiga primers, dNTP-mix, DIG-dUTP (digoxigenin-deoxyuridin trifosfat) samt Klenowenzym märktes DNA-proberna med dUTP genom slumpmässig infästning. 4 µl av varje PCR-produkt från amplifiering med primerkombinationerna enligt tabell 3 blandades i ett rör. DNA-proberna denaturerades under 10 minuter i 95°C innan tillsatts av buffertlösningen. Provet inkuberades sedan i 37°C i 20 timmar under vilken enzymet verkade och märkte proberna med digoxigenin-dUTP. Reaktionen avbröts genom uppvärmning i 65°C i 10 minuter.

Innan membranerna tvättades med DIG-labeled DNA-proberna förbehandlades de med DIG Easy Hyb-lösning i 30 minuter under konstant rörelse. DNA-proberna denaturerades genom inkubering i 95°C i 5 minuter, blandades med DIG Easy Hyb-lösning och tillsattes sedan till membranerna. Membranerna inkuberades över natt i 65°C under konstant rörelse. Därefter tvättades membranerna med 2x SSC, 0,1 % SDS i 2 x 5 minuter och sedan med 0,5x SSC, 0,1 % SDS i 2 x 15 minuter.

Vid den immunologiska detektionen behandlades membranerna med blockeringslösnig (blockerar ospecifika bindningsplatser), antikroppslösning (anti-digoxigenin antikroppar binder till DIG-labeled DNA-proberna, vilka vid hybridiseringen bundit till BDV-sekvenser på membranerna), tvättbuffert (0,1 M Maleic acid, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 0,3 % Tween), detektionsbuffert (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) samt en färglösning som visualiserar antikroppsbindningen. Efter tillsats av färglösning till membranerna inkuberades dessa i mörker tills önskat färgomslag sågs. Vid platsen för positiva kolonier på membranerna skedde ett färgomslag till lila.

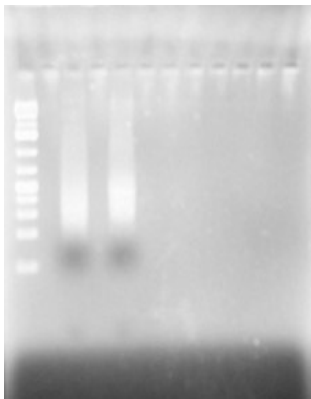
Genom att jämföra membranen och agarplattorna med bakteriekolonierna identifierades och valdes 26 positiva samt 10 negativa kolonier ut. Dessa kolonier fick under ett par timmar växa till i LB-medium inklusive ampicillin (50 mg/ml) i 37°C under rörelse. Därefter utfördes PCR, rening av PCR-produkterna, elektrofores inför cykelsekvensering samt cykelsekvensering såsom beskrivet ovan. Precipitering utfördes genom att först tillsätta 2 µl NaAc (3 M) och 50 µl 99 % etanol till samtliga prover och sedan inkuberades proverna i 20 minuter i rumstemperatur. Rören centrifugerades sedan 2 x 20 minuter vid 13 000 rpm. Mellan centrifugeringarna hölls etanolen av och 250 µl 75 % etanol tillsattes. Efter sista centrifugeringen avlägsnades alla etanol och rören fick torka helt torra. Innan proverna placerades i sekvenseringsmaskinen tillsattes 13 µl formamid till varje prov.

RESULTAT

Elektrofores

Poolade DNA- och cDNA-prover

Eftersom amplifieringen skett helt slumpmässigt sågs inga distinkta band på gelen efter elektroforesen. Figur 2 visar resultat av elektrofores med renade PCR-produkter från poolade DNA- respektive cDNA-prover.



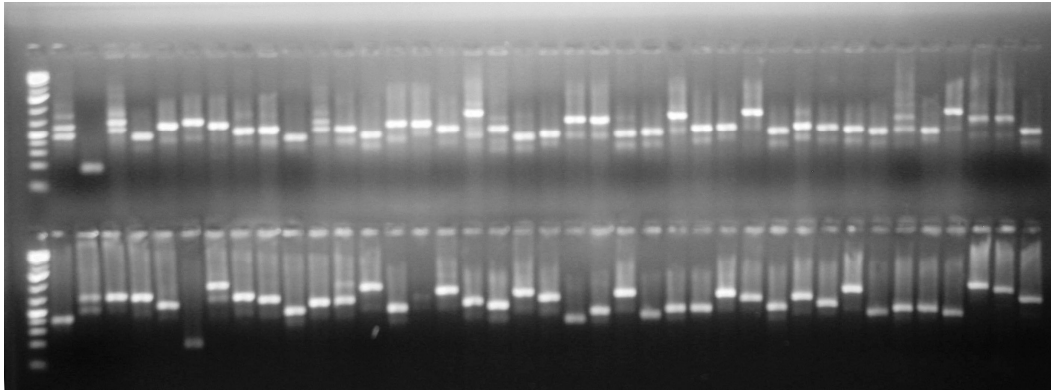
Figur 2. Gelbild med renade PCR-produkter från poolade DNA- respektive cDNA-prover. Brunn 1 innehåller DNA-stegen, brunn 3 PCR-produkter från DNA och brunn 5 innehåller PCR-produkter från cDNA.

DNA

Av de 240 utvalda kolonierna med klonade sekvenser var 196 (82 %) positiva enligt elektroforesen efter PCR-amplifiering. Resterande prover innehöll antingen självligerad vektor (dvs sekvenserna T7 och SP6 på vektorn, ~150 bp) eller så var koncentrationen av PCR-produkten så låg att det inte gick att urskilja något band på gelen. Storleken på sekvenserna varierade mellan ungefär 400 bp och 1000 bp. Dessa längder är inklusive sekvenserna T7 och SP6 på vektorn, eftersom PCR-amplifieringen skedde med primrarna T7 och SP6. Detta gäller även cDNA-sekvenserna.

cDNA

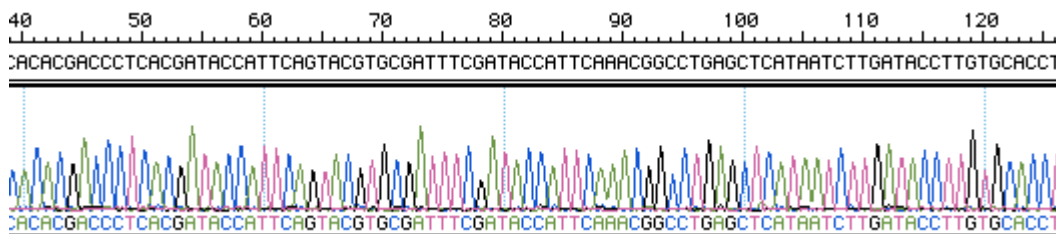
Av de 240 utvalda kolonierna med klonade sekvenser var 212 (88 %) positiva. Storleken på sekvenserna varierade mellan ungefär 300 bp och 1300 bp. Majoriteten låg mellan 500 och 700 bp. Figur 3 visar ett exempel på en av gelbilderna med PCR-produkter efter kloning. Ju starkare band på gelen, desto högre koncentration av PCR-produkt finns i provet.



Figur 3. Gelbild med 78 stycken PCR-produkter innehållande cDNA-sekvenser efter kloning. Brunnarna längst till vänster innehåller DNA-stegen.

Sekvensering

Sekvenserna analyserades och korrigerades med hjälp av ett dataprogram som heter SeqMan. Dataprogrammet tog bort sekvenser som var för korta eller av för dålig kvalitet. Exempel på hur resultatet kan se ut i SeqMan visas i figur 4. Sekvenserna jämfördes sedan med nukleotidsekvenser i databasen på NCBI's (National Center for Biotechnology Information) hemsida. Likheten med olika sekvenser bedömdes med hjälp av programmet BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Som gräns för vad som bedömdes som trolig likhet sattes ett e-värde på minst 10^{-4} . E-värdet beskriver antal träffar som kan förväntas på grund av slump vid sökning i en databas. Ju lägre e-värde, eller ju närmre 0 värdet är, desto mer tillförlitligt är det att sekvenserna verkligen stämmer överens. De sekvenser där ingen tillförlitlig likhet hittades med nukleotidsekvenser, jämfördes i en proteindatabas för att söka efter likheter med aminosyrasekvenser.



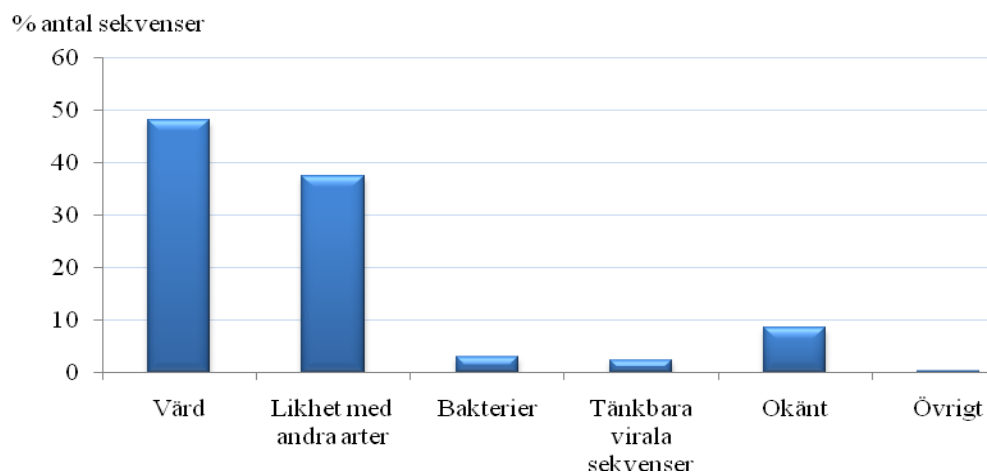
Figur 4. Exempel på resultat vid användning av dye-terminating sekvensering.

DNA och RNA

Eftersom fjällrävens hela genom inte är kartlagt bedömdes sekvenser som visade likhet med DNA respektive RNA inom familjen *Canis* också som värdsekvenser. De sekvenser där ingen trovärdig likhet varken hittades med nukleotid- eller proteinsekvenser bedömdes som okända. Sekvenser som visade likhet med någon bakterie samlades i en gemensam grupp. Exempel på bakterier är *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Bacteroides* spp, *Pasteurella multocida*, *Bordetella petrii*, *Yersinia enterocolitica* och *Neisseria meningitidis*. Sekvenser som inte liknade några kända nukleotidsekvenser men visade likhet med någon aminosyrasekvens, lades till kategorin för proteinets ursprung. I samtliga fall utom ett var detta från bakterier. I gruppen tänkbara virala sekvenser samlades sekvenser som vid samma sökning visade likheter med nukleotidsekvenser från bland annat Gallid herpesvirus 2, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Leishmania braziliensis*, och *Trypanosoma cruzi*. Dessa sekvenser visade inte någon tillförlitlig likhet med någon aminosyrasekvens. Figur 5 visar en alignment av en av sekvenserna där likhet med Gallid herpesvirus 2 påvisades. I kategorin övrigt ingår en sekvens som visade likhet med ett protein från *Paramecium tetraurelia*. Detta är encelliga djur som tillhör protozostammen ciliater. Figur 6 visar ett stapeldiagram med resultaten från samtliga 369 analyserade sekvenser. I tabell 4 och 5 visas en sammanställning av resultaten från sekvenseringen av DNA-respektive RNA-proverna.

Query	21	GGGTAGGGTTAGTggttaggggtattggttagggtaagrgttaggttacgggttaggggtt	80
Sbjct	1615	GGGTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA	1674
Query	81	rggttaggggttaggggttaggggtcagggaagggtccaggtacgggttaggggtta	140
Sbjct	1675	GGGTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA	1734
Query	141	gggttaggggttaggggtactggtttgggttaggattaggggttagTGTATAGTAagggttta	200
Sbjct	1735	GGGTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA	1794
Query	201	ggttttagcgttagggt-aatggttacgggttagggttaggggttaggggtacaggatagggtt	259
Sbjct	1795	GGGTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT	1853
Query	260	agggttagagtaagggttaatggttagaggttagATTAGTATTAGGGTTCGGGTAGGGTTA	319
Sbjct	1854	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT	1913
Query	320	TGTTTATAGTTTACGCT-GGGTACGGGTATGTACGGGTAGGATATGTGTACGGGT	378
Sbjct	1914	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT	1973
Query	379	AGGCTTAGG 387	
Sbjct	1974	AGGGTTAGG 1982	

Figur 5. Alignment av en av sekvenserna med Gallid herpesvirus 2.



Figur 6. Sammanställning av samtliga sekvenser.

Tabell 4. Sekvenseringsresultat DNA

Ursprung	Antal sekvenser	% av totalt antal sekvenser
Vård	104	55,3
Likhet med andra arters DNA	35	18,6
Bakterier	10	5,3
Tänkbara virala sekvenser	9	4,8
Okänt	29	15,4
Övrigt	1	0,5
Totalt	188	100 %

Tabell 5. Sekvenseringsresultat RNA

Ursprung	Antal sekvenser	% av totalt antal sekvenser
Vård	74	40,9
Likhet med andra arters RNA	103	56,9
Bakterier	1	0,6
Okänt	3	1,6
Totalt	181	100 %

Kolonihybridisering

Av de 30 prover som sekvenserades, analyserades 18 stycken i SeqMan och BLAST. Resterande tog dataprogrammet SeqMan bort på grund av för korta sekvenser eller sekvenser av för dålig kvalitet. Detta gjorde att det blev kvar 10 positiva prover och 8 negativa prover. Av de 10 positiva proverna var det endast 2 stycken (20 %) som innehöll sekvenser som med stor sannolikhet var BDV och alltså var sant positiva. Övriga 8 positiva var falskt positiva. Samtliga 8 negativa prover var sant negativa. De falskt positiva och sant negativa proverna innehöll sekvenser som visade tillförlitlig likhet med rRNA från *Rattus Norvegicus*. Ett av de negativa proverna innehöll sekvenser som liknade mRNA från *Rattus Norvegicus*.

DISKUSSION

Detta arbete resulterade tyvärr inte i identifiering av något virus som med säkerhet kan sägas vara orsaken till encefalit hos fjällrävarna. Totalt har 369 sekvenser analyserats och jämförts med kända sekvenser i genbanken. Av dessa sekvenser var 178 stycken (48 %) med stor sannolikhet från värddjuret, dvs fjällräven. Även de sekvenser som visade likhet med andra arters genom kan inte uteslutas komma från fjällrävarna då hela deras genom inte är beskrivet. Anledningen till att större delen av sekvenserna kom från värd eller sannolikt från värden är att vid slumpmässig amplifiering, så som skett här, amplifieras inte bara virusets genom utan även exempelvis värddjurets DNA, rRNA och mRNA. Värddjurets genom finns också i betydligt högre koncentration än eventuellt virus. De sekvenser som ingår i kategorin tänkbara virala sekvenser innehöll en kort sekvens, så kallad mikrosatellit (TTAGGG i detta fall, se figur 5), som upprepades flera gånger efter varandra. På grund av deras repetitiva natur går det inte att avgöra om sekvenserna verkligen kommer från virus, värd etc. Vissa av dessa tänkbara virala sekvenser visade även likhet med sekvenser inom familjen *Canis*. Just dessa sekvenser uppvisade inte exakt samma upprepning av samma sekvens utan varierade något mer i nukleotidsekvenserna. Detta skulle kunna tyda på att dessa sekvenser med större sannolikhet kommer från värddjuret än sekvenser där ingen likhet alls hittades med familjen *Canis*. Inga av de bakteriearter som tidigare nämnts är kända för att orsaka encefalit hos djur. *Escherichia coli*, *Shigella* spp och *Yersinia enterocolitica* orsakar framför allt enteriter, medan *Pasteurella* spp och *Bordetella* spp framför allt är respiratoriska patogener (Quinn *et al*, 2002). *Leishmania* spp är intracellulära parasiter som förekommer hos hund och vilda djur. Sjukdomen kan uppträda dels som en kutan form och dels i en visceral form, men orsakar dock inte encefalit (Urquhart *et al*, 1996). Infektion med *Trypanosoma cruzi* hos hund har diagnostiserats framför allt i USA och orsakar kardiomyopati. Drabbade hundar kan förutom symtom på hjärtpåverkan också uppvisa neurologiska symtom. Hundar är även känsliga för *T. brucei* och *T. congolense*, vilka ger symtom såsom feber, svaghet anorexi och ibland även neurologiska symtom, exempelvis paralys, cirkelgång, inkoordination (Ettinger & Feldman, 2005). Det är oklart om parasiten ger upphov till encefalit.

Det enda virus med vilken någon form av likhet kunde påvisas var Gallid herpesvirus 2. Det är ett alphaherpesvirus som orsakar Marek's sjukdom (hönsförflamning) hos fåglar. Marek's sjukdom är en smittsam lymfoproliferativ sjukdom (Quinn *et al*, 2002) som kan ge upphov till encefalit hos drabbade fåglar (McFerran & McNulty, 1993). Viruset orsakar inflammationer i nerver och/eller hjärna eller tumörer i olika organ. Drabbade fåglar kan visa symtom såsom vinglig gång, förflamning av ben och vingar, beteendeförändringar, andningssvårigheter och sned huvudhållning (SVA, hemsida, 2008-11-28). De fjällrävar som ingår i detta arbete, ingick även i ett examensarbete från 2005. I detta arbete påvisades att samtliga rävar bar på sekvenser som visade likhet med olika herpesvirus, framför allt bovint herpesvirus 1, BHV-1. Detta virus orsakar infektioner i respirations- och genitalorganen hos nötkreatur, samt eventuellt även encefalit. Ett annat bovint herpesvirus, BHV-5 orsakar med säkerhet encefalit hos nötkreatur (Berggren, 2005; Quinn *et al*, 2002). Både BHV-1 och BHV-5 är, liksom Gallid herpesvirus 2, alphaherpesvirus (Quinn *et al*, 2002). Med tanke på att dessa virus orsakar encefalit hos sina respektive värddjur samt att sekvenser som

mer eller mindre liknar dessa virus identifierats hos undersökta fjällrävar, skulle en tänkbar orsak till deras sjukdom kunna vara ett hittills okänt herpesvirus. De fynd av herpesliknandesequenser som gjorts i detta arbete, stöder tidigare forskning om fjällrävarnas sjukdom och påvisande av herpesvirus hos fjällrävar med encefalit.

Det kan finnas flera orsaker till att inga virus med säkerhet kunde påvisas i denna studie. Ett stort problem vid forskning kring virus är, som tidigare nämnts, att viruset ofta finns i mycket låg koncentration. Detta gör att det behövs betydligt mer sekvensdata, exempelvis genom storskalig sekvensering, än vad som ingår i detta arbete, för att påvisa eventuella virus. Fjällrävarna som undersökts var i slutstadiet av sjukdomen och i mycket dålig kondition vid avlivning, vilket kan innebära att mängden virus sjunkit till en icke-detekterbar nivå. Det organmaterial som undersöks kan också påverka hur svårt påvisande av eventuellt virus kan vara. CSF är bra material att jobba med då det oftast innehåller högre koncentration av viruset och längre av bakgrunden jämfört med övriga vävnader, exempelvis hjärna. Vid val av individ kan ett djur som saknar virus väljas. En annan orsak kan vara att vid preparation av kliniskt material är det inte säkert att just den bit som skärs ut från exempelvis hjärnvävnaden verkligen innehåller virus. Om inte viruskoncentrationen är tillräckligt hög är risken stor att missa viruset då endast vävnadsbitar om 0,5 x 0,5 cm användes. Det är även möjligt att virus förekommer hos individen men i något annat organ. En ytterligare anledning till "negativt" resultat skulle kunna vara förekomst av virus som är större än 0,45 µm, vilket gör att de fastnar i filtret som används vid bortfiltrering av exempelvis bakterier. Dessa stora virus är dock ovanliga men förekommer.

I detta arbete valdes att poola proverna från fjällrävarna istället för att analysera enstaka prover var för sig. Nackdelen med poolade prover är att varje enskilt prov späds ut. Om viruskoncentrationen från början redan är låg gör detta koncentrationen ännu lägre och chansen att identifiera viruset minskar. Fördelen med poolade prover är att möjligheten att hitta någon positiv individ ökar och risken att missa någon individ som bär på viruset minskar, eftersom fler prover kan undersökas samtidigt. Dessutom är det mer tidseffektivt och mer praktiskt hanterbart. Om det visar sig att det poolade provet innehåller någon intressant sekvens, går man tillbaka och kontrollerar vilka djur som ingick i just det provet. Varje enskild individ kan sedan undersökas var för sig för att utreda vem som bär på viruset. Nackdelen med att välja ut enstaka individer för undersökning är det finns risk att "fel" individ väljs ut, dvs individ som saknar sjukdomsagens.

RiboMinusTM Transcriptome Isolation Kit är som tidigare nämnts framtaget för människa och mus, och det är osäkert hur väl det fungerar på andra djurslag. Även om detta steg används så kan proverna i slutet ändå visa sig innehålla rRNA. Om det inte finns något RNA-virus i proverna utan endast rRNA och mRNA så tar Ribominus-steget bort en del av det rRNA som finns, men inte allt, så det kommer ändå att finnas kvar rRNA i provet. För att minska problematiken med att en stor andel av prover innehåller rRNA kommer det förhoppningsvis i framtiden utvecklas en metod som är specifikt framtaget för flera olika djurslag.

Anledningen till utförandet av kolonihybridisering i detta arbete var att det skulle utgöra ett första steg i utvärdering av hur väl metoden fungerar för att underlätta identifieringen av positiva kloner. I nuläget krävs sekvensering av väldigt många kolonier för att identifiera ett mindre antal positiva kloner vid forskning om okända virus. Som ett ytterligare steg i utvärdering av kolonihybridiseringen skulle resultaten kunna jämföras med när steget för borttagning av rRNA med RiboMinusTM används. När man dragit bort rRNA från proverna har virusets RNA chans att komma fram mer och förhoppningsvis kommer andelen sant positiva kolonier öka. Statistik skulle då kunna utföras för att jämföra resultaten av kolonihybridisering och borttagning av rRNA. Om det visar sig vara hög tillförlitlighet skulle kolonihybridisering kunna tillämpas för att identifiera sant positiva kloner vid utvärdering av metoder för att identifiera okända virus på ett enklare och effektivare sätt.

Vid kolonihybridisering är problemet, liksom vid all virusforskning, att proverna inte enbart innehåller DNA/RNA från viruset utan även bakgrund, dvs världens DNA/RNA och rRNA. Dessutom förekommer virusets genom ofta i väldigt låg koncentration, vilket gör det svårare att identifiera viruset. Jag upptäckte att det också var svårt att verkligen vara säker på att rätt koloni hittas vid jämförelse mellan membran och agarplattor. En orsak till de falskt positiva kolonierna vid hybridiseringen kan alltså vara att jag inte lyckades identifiera rätt positiv koloni. Trots olika markeringar på membranen och plattorna var det inte helt lätt att orientera sig bland kolonierna och framför allt inte på plattor med många kolonier. En annan orsak kan vara att proverna kan binda ospecifikt till andra sekvenser än BDV-sekvenser. Vid tvättningen av membranen efter själva hybridiseringen är det inte heller säkert att de prober som bundit ospecifikt tvättas bort, utan kommer sedan att ge utslag som positiva kolonier när antikroppar bundit till dem.

I detta arbete ingår för få kolonier för att kunna göra en statistisk signifikant utvärdering av metoden. För att utvärdera metoden ordentligt behövs att fler kolonier sekvenseras samt att protokollet justeras för att optimera förhållandena. Till exempel kan hybridiseringstemperaturen behöva ändras för att proverna ska binda mer specifikt. Om temperaturen är för hög sker ingen hybridisering och om temperaturen är för låg ökar risken för ospecifik bindning (Brown, 2001). Proverna som användes i detta arbete var även av något olika längd, vilket gör att den optimala hybridiseringstemperaturen kan variera för respektive probe.

För att inte fjällräven ska utrotas krävs fortsatta åtgärder såsom skett inom SEFALO. Ytterligare forskning kring rävarnas sjukdomstillstånd bör utföras för att hitta orsaken samt undersöka om sjukdomen förekommer hos vilda rävar. Insjukna fjällrävar skulle kunna undersökas i ett tidigare sjukdomsstadium för att öka chansen att viruskoncentrationen fortfarande är hög och detekterbar. Självdöda vilda fjällrävar som hittas i naturen bör skickas in till SVA för obduktion, histopatologisk undersökning samt analys av förekomst av eventuella virus. Ett nytt uppfödningförsök skulle kunna prövas, exempelvis med fjällrävar som studerats i det vilda och som dittills med säkerhet inte uppvisat några centralnervösa symtom eller symtom på andra sjukdomar.

TACK

Jag vill ge ett stort tack till mina handledare, som med stor kunnighet och tålamod handlett mig genom detta arbete.

Ett stort tack även till SEFALO som finansierat projektet.

Till sist vill jag även tacka personalen på avdelningen för Parasitologi och Virologi på SVA för vänligt bemötande och hjälpande händer när frågetecken dykt upp på laboratoriet.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Allander, T., Emerson, S.U., Engle, R.E, Purcell, R.H & Bukh, J. (2001) A virus discovery method incorporation DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *PNAS* 98, 11609-11614.
- Allander, T., Tammi, M.T., Eriksson, M., Bjerkner, A. Tiveljung-Lindell, A. & Andersson, B. (2005) Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *PNAS* 102, 12891-12896.
- Ambrose, H.E. & Clewley, J.P. (2006) Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Reviews in Medical Virology* 16, 365-383.
- Berg, A-L., Gavier-Widén, D., Nilsson, K., Widén, F., Berg, M., Gregorius, S., Ågren, E., Erlandsson, M. & Mörner, T. (2007) Necrotizing encephalitis of unknown causes in Fennoscandian arctic foxes (*Alopex lagopus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 113-117.
- Berggren, L. (2005) Studier på ett unikt herpesvirus hos fjällrävar med encefalit. Examensarbete 2005:65. Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet. ISSN 1652-8697
- Brown, T.A. (2001) *Gene cloning & DNA analysis*. 5. ed. Oxford: Blackwell Publishing
- Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2005) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6. ed. St. Louis: Elsevier Saunders
- McFerran, J.B. & McNulty, M.S. (Eds.) (1993) *Virus Infections of Birds*. Amsterdam: Elsevier
- Projekt Fjällräv SEFALO+. Hemsida. [online] (2008-06-05) Tillgänglig: <http://www.zoologi.su.se/research/alopex/hem.htm> [2008-09-03]
- Projekt Fjällräv SEFALO+. Layman's Report 2008. [online] Tillgänglig: <http://www.zoologi.su.se/research/alopex/publications.html> [2008-09-03]
- Projekt Fjällräv SEFALO. Slutrapport juli 1998-december 2002. [online] Tillgänglig: <http://www.zoologi.su.se/research/alopex/publications.html> [2008-09-03]
- Promega. Hemsida. [online] Tillgänglig: <http://www.promega.com> [2008-11-22]
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (2002) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Oxford: Blackwell Publishing
- Reyes, G.R. & Kim, J.P. (1991) Sequence-independent, single-primer amplification of complex DNA populations (SISPA). *Molecular and Cellular Probes* 5, 473-481.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- SVA. Hemsida. [online] (2007-04-20) Tillgänglig: <http://www.sva.se> [2008-11-28]
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. (1996) *Veterinary Parasitology*. 2. ed. Oxford: Blackwell Publishing
- WWF – Världsnaturfonden. Hemsida. [online] (2008-05-27) Tillgänglig: <http://www.wwf.se/press/1179265-fjallravsstammen-okar-men-varmare-klimat-och-rodrav-ar-orosmoln> [2008-09-09]